· 论著 ·

利用废弃白细胞滤器回收免疫细胞的工艺优化及 NK 细胞培养研究

周雪冰[1]　李茹意[1]　袁红[1]　张雪松[1]　史雨[1]　杨旭[1]　窦柏蕊[2]　焦立新[1]　韩瑜[1]
(1. 长春市中心血站,吉林 长春 130033;2. 吉林国健生命工程科学技术有限公司,吉林 长春 130000)

摘要:目的　通过优化废弃白细胞滤器反冲回收免疫细胞的技术工艺,探讨不同反冲液及反冲条件(温度、浸泡、超声)对细胞回收率的影响并评估从回收细胞中分离培养 NK 细胞的可行性与质量。**方法**　以生理盐水、PBS 和 PBS-EDTA 为反冲液反冲滤器,比较白细胞回收率;通过调节反冲液温度、滤器浸泡处理及超声处理优化反冲效果;采用 Ficoll 分离法从洗脱液中分离单个核细胞(PBMCs)并进行体外扩增培养;利用流式细胞术识别和鉴定淋巴细胞亚群的百分比。**结果**　生理盐水作为反冲液效果最稳定。反冲温度对白细胞亚群回收率具有显著影响,37℃反冲的淋巴细胞和单核细胞回收率明显高于 4℃[(35.56±5.55)% *vs* (22.88±0.31)%,(32.42±4.82)% *vs* (8.00±1.6)%,t 值分别为 5.581、5.758,均为 $P<0.001$)]和 25℃[(35.56±5.55)% *vs* (22.42±6.13)%,$t=5.904$,$P<0.001$;(32.42±4.82)% *vs* (21.11±1.23)%,$t=2.629$,$P=0.030$),37℃浸泡后反冲白细胞亚群回收率均高于 37℃直接反冲,但差异无统计学意义($P>0.05$)。25℃超声浸泡反冲白细胞亚群回收率较 25℃浸泡反冲进一步升高,但差异无统计学意义($P>0.05$)。分离培养获得的 NK 细胞纯度达(94.2±4.5)%,活率为(94.8±0.9)%;经 15 d 培养,细胞总数扩增约 450 倍,最终可获得≥10^9 个/mL 高活性 NK 细胞。**结论**　通过优化反冲工艺可从废弃白细胞滤器中高效回收免疫细胞,其中 37℃反冲液反冲效果最佳,浸泡和超声处理可作为辅助手段提高回收率。白细胞滤器来源的 NK 细胞纯度高、活性好、扩增能力强,可作为免疫治疗研究的可靠细胞来源并符合资源再利用的循环经济理念。

关键词:白细胞滤器;细胞回收率;温度;超声;免疫细胞;NK 细胞
中图分类号:R457.1　R331.1+42　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1004-549X(2026)7-0846-07
DOI:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2026.07.005

Process optimization for recycling immune cells from discarded leukocyte filter and research on NK cell culture

ZHOU Xuebing[1], *LI Ruyi*[1], *YUAN Hong*[1], *ZHANG Xuesong*[1], *SHI Yu*[1], *YANG Xu*[1], *DOU Bairui*[2], *JIAO Lixin*[1], *HAN Yu*[1]. 1. *Changchun Central Blood Station*, *Changchun* 130033, *China*; 2. *Jilin Guojian Life Engineering Science and Technology Co Ltd*, *Changchun* 130000, *China*.
Corresponding author: *HAN Yu*, *Email*:47364847@*qq.com*

Abstract:Objective　To optimize the technology and process for recovering immune cells from discarded leukocyte filter through reverse flushing, and to investigate the effects of different reverse flushing solutions and physical conditions (temperature, soaking, and ultrasound) on the cell recovery rate. Additionally, to evaluate the feasibility and quality of isolating and culturing NK cells from the recovered cells. **Methods**　Normal saline, PBS, and PBS-EDTA were used as reverse flushing solutions to backwash the filter, and the white blood cell recovery rates were compared. The reverse flushing efficiency was optimized by adjusting the temperature of the reverse flushing solution, filter soaking treatment and ultrasonic treatment. The Ficoll separation method was employed to isolate peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) from the elution solution and conduct in vitro expansion and culture. Lymphocyte subsets were identified and quantified using flow cytometry. **Results**　The physiological saline served as the backflush fluid was the most stable. The reverse temperature had a significant impact on the recovery rate of white blood cell subgroups. The recovery rates of lymphocytes and monocytes at 37℃ were significantly higher than those at 4℃[(35.56±5.55)% *vs* (22.88±0.31)%, (32.42±4.82)% *vs* (8.00±1.6)%, $t=5.581$ and 5.758, respectively, both $P<0.001$)],and at 25℃ [(35.56±5.55)% *vs* (22.42±6.13)%, $t=5.904$, $P<0.001$; (32.4±4.82)% *vs* (21.11±1.23)%, $t=2.629$, $P=0.030$)]. The recovery rates of white blood cell

基金项目:2024 年度长春市医疗卫生机构和生物医药企业联合发展科技专项(2024CWY18)
第一作者简介:周雪冰(1996-),女,主管技师,Email:1605350548@qq.com;**通信作者:**韩瑜,Email:47364847@qq.com

subgroups after 37℃ immersion were higher than those after direct reverse flow at 37℃, but the difference was not statistically significant (P>0.05). The recovery rate of cells after ultrasonic immersion at 25℃ was further increased compared to that after immersion at 25℃, but the difference was not statistically significant (P>0.05). The purity of the NK cells obtained through sorting reached (94.2±4.5)%, and the viability was (94.8±0.9)%. After 15 days of culture, the cell count was expanded approximately 450 times, yielding more than 10^9/mL highly active NK cells. **Conclusion** By optimizing the backflushing process, immune cells can be efficiently recovered from discarded filters. The 37℃ backflow liquid has the best backflow effect; soaking and ultrasonic treatment can be used as auxiliary methods to improve recovery rates. The NK cells from this source have high purity, good activity, and strong expansion ability, and can be used as a reliable cell source for immunotherapy research, and in line with the circular economy concept of resource reuse.

Key words: leukocyte filter; cell recovery rate; temperature; ultrasound; immune cells; NK cells

目前在临床上去白悬浮红细胞已得到广泛应用。输注去除白细胞的血液成分能有效预防非溶血性发热反应、输血后移植物抗宿主病、同种免疫反应、血小板输注无效以及免疫抑制等多种输血并发症[1-2]。采供血机构通常采用过滤法(滤除白细胞)来制备去白细胞血液制品。白细胞滤器是利用其滤膜的机械拦截和吸附作用,使白细胞滞留在滤盘纤维中。目前常用的白细胞滤器滤膜材质多为聚氯乙烯(PVC)或聚酯(PET),不同材质的滤膜表面电荷、疏水性及蛋白吸附能力存在差异,这些理化特性可能影响白细胞与滤器纤维的黏附强度与后续的反冲解离效率。白细胞滤器在过滤完成后是作为医疗废弃物处理的,但这些被废弃的滤器中实际上蕴含着丰富的、具有潜在应用价值的免疫细胞资源[3-4]。近年来,以细胞免疫疗法为代表的基础与临床研究发展迅速,免疫细胞的来源问题日益成为制约基础科研及临床转化的关键瓶颈之一,而白细胞滤器反冲技术为解决这一难题提供了新思路[5-6]。该技术通过逆向流体冲击或物理振荡,将截留在滤器中的目标细胞[如外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs)、造血干细胞等]冲洗出来,实现了对珍稀血液资源的二次利用[7]。但不同研究采用的操作条件差异较大,其对细胞回收效率的影响尚缺乏系统比较。为此,本研究系统考察了反冲液类型、温度、浸泡处理和超声处理对白细胞回收效率的影响。其中,浸泡处理旨在通过延长液相接触时间促进细胞从滤器纤维上解吸附。超声处理则基于空化效应可破坏细胞与纤维物理嵌顿的理论原理,其在滤器反冲中的应用效果尚未见系统报道。本研究旨在系统探讨从白细胞滤器中回收各类免疫细胞的数量情况及其影响因素,特别是反冲液温度对细胞收获效果的影响,并评估从回收的免疫细胞中分离培养自然杀伤细胞(natural killer cells,NK cells)的可行性与质量,进一步论证从白细胞滤器获得免疫细胞的可行性及优势,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 血液成分(白细胞滤器)来源

所有白细胞滤器[PT-T-400,滤膜材质为聚氯乙烯(PVC),山东威高输血技术装备有限公司,批号:2511214)均来自长春市中心血站采集的全血去白后的废弃滤器,共 55 个。400 mL 全血采集后按照《全血及成分血质量要求》立即置于 4℃冷链系统保存及运输,并在采血后 6 h 内完成白细胞过滤(即“冷血过滤”)。过滤后的废弃滤器于 4℃保存,并在 1 h 内完成反冲处理[4]。

1.2 试剂与仪器

生理盐水(山东威高输血技术装备有限公司,批号:2410274);磷酸盐缓冲液干粉(上海龙田生物科技有限公司,批号:20241226,PBS);乙二胺四乙酸(EDTA)[普洛麦格(北京)生物技术有限公司,批号:0000213242];样本密度分离液(天津灏洋公司,批号:20241113);细胞冻存液(Corning 公司,批号:88702CB053);T75 无菌培养瓶(赛默飞世尔公司,批号:156499);kit02 人冻存单个核细胞来源 NK 细胞激活扩增试剂盒(含有包被因子、刺激因子 1—3 各 1 支,扩增因子 2 支,novaNK-20 NK 细胞无血清培养基 2 瓶)(苏州华辰公司,批号:20240902);人血小板裂解物(苏州华辰公司,批号:20240607);AO/PI 染料(Nexcelom 公司,批号:3433111);淋巴细胞亚群检测试剂盒(含荧光素标记抗体:CD3-FITC,CD4-APC,CD8-PE,CD16-PE,CD19-APC,CD56-PE)(BD Biosciences 公司,批号:49992);DK-8AX 恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司)、XM-26A 超声处理仪(小美超声仪器昆山有限公司);BC-5000 全自动血细胞分析仪(中国迈瑞

医疗器械有限公司);OEM802-BT300SV2-CE 蠕动泵(保定雷弗流体科技有限责任公司);BD FACS Canto Ⅱ流式细胞仪(BD Biosciences 公司);Cellometer K2 荧光细胞计数仪(Nexcelom 公司)。

1.3　方法

1.3.1　反冲液制备

1)磷酸盐缓冲液(PBS):取 1 包 PBS 干粉,溶于超纯水中,定容至 1 L,高压灭菌,pH7.2;2)含 2 mmol/L EDTA 的 PBS 缓冲液(PBS-EDTA):配制 0.5 mol/L EDTA 储存液,称取 EDTA 18.61 g,加入适量超纯水,用 NaOH 调至 pH 8.0 使其完全溶解,定容至 100 mL,高压灭菌,用 PBS 稀释至终浓度 2 mmol/L,pH7.4。

1.3.2　标本收集

55 袋 400 mL 全血均为随机挑取,留取 3-5 mL 血辫标本作为各项血液成分指标初始参考,血袋按照滤白操作流程操作,待血液全部滤净后,滤器进行反冲,收集洗脱液并使用全自动血细胞分析仪检测各项指标。

1.3.3　白细胞滤器中 PBMCs 的回收

全血过滤后 1 h 内进行 PBMCs 回收,所有反冲均使用蠕动泵(350 rpm,1 750 mL/min)进行操作。实验环境:所有操作均在恒温实验室中进行,环境温度控制在(25±1)℃(经温湿度计实时监测)。

1.3.3.1　不同配方反冲液对回收率的影响

在室温(25℃)环境下,分别用不同配方的反冲液(生理盐水、PBS、PBS-EDTA)对白细胞滤器进行反冲,反冲洗脱液回收入原血袋混匀待检。每个反冲液配方均使用 5 个白细胞滤器做平行试验。选取反冲效果最佳的缓冲液进行后续实验。

1.3.3.2　不同反冲条件对回收率的影响

1)4℃:用 60 mL 4℃生理盐水反冲白细胞滤器,洗脱液回收入原血袋混匀待检;2)25℃:用 60 mL 25℃生理盐水反冲白细胞滤器,反冲洗脱液回收入原血袋混匀待检;3)37℃:用 60 mL 37℃生理盐水反冲白细胞滤器,反冲洗脱液回收入原血袋混匀待检。4)4℃浸泡:先向白细胞滤器注入 6 mL 4℃生理盐水浸泡 30 min,再用 54 mL 同温生理盐水反冲,反冲洗脱液回收入原血袋混匀待检;5)25℃浸泡:先向白细胞滤器注入 6 mL 25℃生理盐水浸泡 30 min,再用 54 mL 同温生理盐水反冲,反冲洗脱液回收入原血袋混匀待检;6)37℃浸泡:先向白细胞滤器注入 6 mL 37℃生理盐水浸泡 30 min,再用 54 mL 同温生理盐水反冲,反冲洗脱液回收入原血袋混匀待检;7)25℃超声:白细胞滤器经超声(基于考察细胞完整性的预试验,设定超声条件为 100 W,20 kHz,5 min,间歇 10 s)处理后,用 60 mL 室温生理盐水反冲,反冲洗脱液回收入原血袋混匀待检;8)25℃超声浸泡:先向白细胞滤器注入 6 mL 室温生理盐水浸泡 30 min,再经上述超声处理,最后用 54 mL 室温生理盐水反冲,反冲洗脱液回收入原血袋混匀待检。每个反冲条件均使用 5 个白细胞滤器做平行试验。

1.3.4　免疫细胞计数及细胞回收率计算

将反冲洗脱液用血细胞分析仪检测洗脱液及滤白前全血中的各类免疫细胞(白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞)计数。由于献血者个体差异导致初始白细胞基数不同,无法直接比较绝对计数,故采用回收率(回收细胞数占原全血细胞比例)作为评价指标。细胞回收率计算公式:细胞回收率=[(反冲后细胞计数×60 mL)/(反冲前细胞计数×400 mL)]×100%。

1.3.5　PBMCs 的分离

将反冲洗脱液(来自 25℃超声条件的滤器)缓慢叠加于 Ficoll 分离液上层,20℃ 800 ×g 离心 15 min(离心机加速和减速均调为最低档);吸取白膜层加入 2 倍体积的 PBS 中,混匀后,20℃ 600×g 离心 10 min,去上清,用 novaNK-20 培养基重悬即得 PBMCs,吹打混匀后,取样进行细胞计数及活率、内毒素、微生物等的检测。取 3 个滤器的洗脱液做平行试验。

1.3.6　NK 细胞培养与扩增

取 2×10^7/mL 分离后的 PBMCs,用 20 mL novaNK-20 基础培养基(含 20%血小板裂解物 4 mL、刺激因子Ⅰ400 μL 和刺激因子Ⅱ 200 μL)重悬细胞,并接种于预先包被好的 T75 培养瓶中(d0),置于 37℃ CO_2 培养箱中静置培养 3-4 d。每隔 2-3 d 进行补液,当细胞密度较高且中等以上细胞团块较多时使用激活培养基(1 L novaNK-20 基础培养基含扩增因子 1.5 mL 和刺激因子Ⅲ 1 mL)进行补液,每 3 d 用荧光细胞计数仪计数 1 次,培养至 d15 时计数细胞并计算扩增倍数(扩增倍数=当日细胞总数/2×10^7/mL),以上操作步骤严格按照 NK 细胞激活扩增试剂盒说明书执行。取 3 份分离后的 PBMCs 做平行试验。

1.3.7　流式细胞术检测各类型免疫细胞比例

取 1×10^6 待检细胞,用 PBS 洗涤后加入荧光素标记抗体(CD3-FITC, CD4-APC, CD8-PE, CD16-

PE,CD19-APC,CD56-PE),4℃ 避光孵育 30 min。洗涤后用流式细胞仪检测荧光强度,使用 FACSDiva 软件获取至少 10 000 个细胞,FlowJo 软件分析数据。淋巴细胞根据 FSC/SSC 设门,NK 细胞定义为 $CD3^-CD16^+CD56^+$,B 细胞定义为 $CD19^+$。

1.4 统计学分析

使用 SPSS29.0 软件和 Graphpad Prism9.0 软件进行数据统计及作图,组间比较采用 Student's t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同配方反冲液反冲的白细胞回收率比较

生理盐水反冲的细胞回收率最高,为(25.46 ± 2.01)%,PBS 为(21.63 ± 5.95)%,PBS-EDTA 为(21.11 ± 3.39)%,3 者两两比较无差异(均为 $P>0.05$),见图 1。生理盐水反冲的细胞回收率变异系数(CV = 7.89%)低于 PBS(27.53%)和 PBS-EDTA(16.08%),表明生理盐水反冲结果更稳定。因此后续试验选择生理盐水作为反冲液。

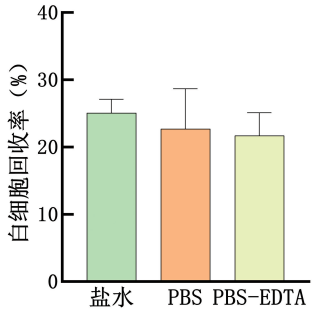


图 1 不同配方反冲液的白细胞回收率比较

Figure 1 Comparison of white blood cell recovery rates using different formulations of backflush solution

2.2 不同反冲条件对白细胞回收率的影响

与 4℃反冲的细胞回收率(9.18±0.37)%相比,25℃反冲的细胞回收率(16.55±3.92)%和 37℃反冲的细胞回收率(18.91±4.27)%均显著升高($t=4.179$,$P=0.003$;$t=5.075$,$P=0.001$)。与 25℃反冲相比,37℃反冲和 25℃超声反冲的细胞回收率(14.44±1.37)%均无差异(均为 $P>0.05$)。与 25℃浸泡反冲的细胞回收率(16.47±2.78)%相比,37℃浸泡反冲的细胞回收率(24.22±3.49)%显著升高($t=3.883$,$P=0.005$),25℃超声浸泡反冲的细胞回收率(19.18±1.29)%无差异($P>0.05$),37℃浸泡反冲的细胞回收率高于 37℃反冲,但差异无统计意义($P>0.05$)。见图 2。

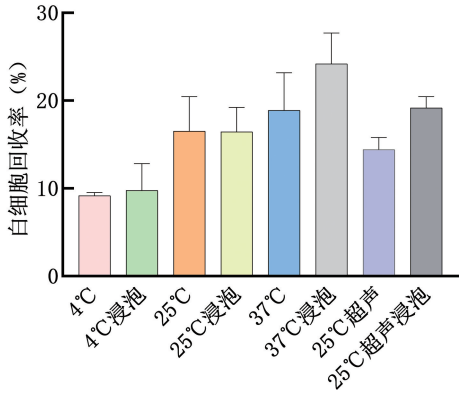


图 2 不同反冲条件对白细胞回收率的影响

Figure 2 The influence of various backflush conditions on the recovery rate of white blood cells

2.3 不同反冲条件对中性粒细胞回收率的影响

与 4℃反冲的细胞回收率(4.26±0.31)%相比,25℃反冲的细胞回收率(13.20±6.13)%和 37℃反冲的细胞回收率(10.36±5.55)%均显著升高($t=3.259$,$P=0.011$;$t=2.453$,$P=0.040$),但 25℃反冲和 37℃反冲的细胞回收率无差异($P>0.05$)。与 25℃反冲相比,25℃超声反冲的细胞回收率(3.69±2.71)%无差异($P>0.05$)。37℃浸泡反冲的细胞回收率(13.10±3.88)%和 25℃超声浸泡反冲的细胞回收率(10.64±2.43)%与 25℃浸泡反冲的细胞回收率(10.31±5.45)%相比无差异(均为 $P>0.05$),37℃浸泡反冲的细胞回收率高于 37℃反冲,但差异无统计意义($P>0.05$)。见图 3。

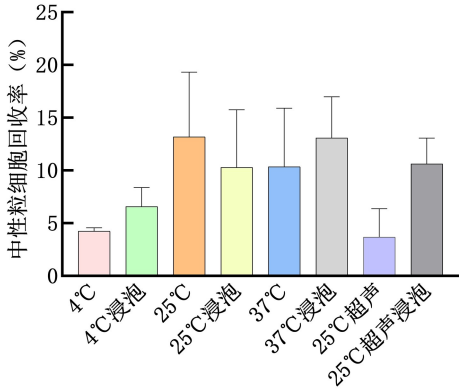


图 3 不同反冲条件对中性粒细胞回收率的影响

Figure 3 The influence of various backflush conditions on the recovery rate of neutrophils

2.4 不同反冲条件对淋巴细胞回收率的影响

与 4℃反冲的细胞回收率(22.88±0.31)%相比,37℃反冲的细胞回收率(35.56±5.55)%显著升高($t=5.581$,$P<0.001$),而 25℃反冲的细胞回收率(22.42±6.13)%无差异($P>0.05$)。与 25℃反冲相比,37℃反冲的细胞回收率显著升高($t=$

5.904,P<0.001),25℃超声反冲的细胞回收率(19.74±2.71)%无差异(P>0.05)。37℃浸泡反冲的细胞回收率(39.95±3.88)%显著高于25℃浸泡反冲的细胞回收率(26.88±5.45)%(t=3.03,P=0.016),而25℃超声浸泡反冲的细胞回收率(34.17±2.43)%高于25℃浸泡反冲,但差异无统计学意义(P>0.05)。37℃浸泡反冲的细胞回收率高于37℃反冲,但差异无统计意义(P>0.05)。见图4。

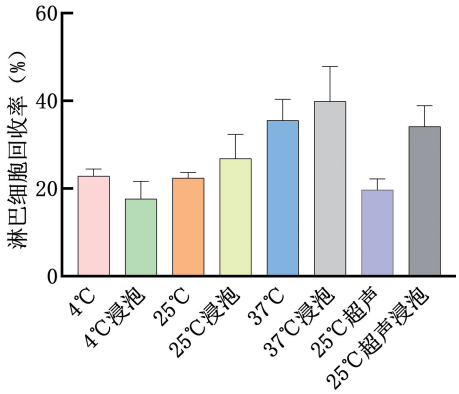


图4　不同反冲条件对淋巴细胞回收率的影响

Figure 4　The influence of various backflush conditions on the recovery rate of lymphocytes

2.5　不同反冲条件对单核细胞回收率的影响

与4℃反冲的细胞回收率(8.00±1.6)%相比,25℃反冲的细胞回收率(21.11±1.23)%和37℃反冲的细胞回收率(32.42±4.82)%均显著升高(t值分别为6.352、5.758,均为P<0.001)。与25℃反冲相比,37℃反冲的细胞回收率显著升高(t=2.629,P=0.030),25℃超声反冲的细胞回收率(7.65±2.5)%明显降低(t=3.965,P=0.004)。37℃浸泡反冲的细胞回收率(27.0±7.94)%与25℃浸泡超声反冲的细胞回收率(22.42±4.73)%较25℃浸泡反冲的细胞回收率(20.26±5.47)%进一步升高,但差异无统计学意义(P>0.05),见图5。

2.6　NK细胞的活性与扩增能力鉴定

分离培养后NK细胞的纯度为(94.2±4.5)%,满足后续高质量扩增研究的需求。同时,分离后立即测定NK细胞的活率为(94.8±0.9)%,表明分离过程温和,未对细胞造成显著损伤。对PBMCs分离液及NK细胞进行安全性检测,结果显示内毒素含量<0.03 EU/mL,培养未检到人型支原体和解脲脲原体,常规无菌检测均为阴性,未见微生物生长。NK细胞数量和扩增能力随着体外培养时间的延长而逐渐增多和增强,培养d15时,NK细胞总数>10^9个/mL,大约扩增了450倍,显示出强大的体外扩增潜力。同时随着培养时间的延长,NK细胞存活率波动幅度不大。白细胞滤器洗脱液经体外分离培养可得到比例高达90%的NK细胞,表明细胞活率维持在高水平。随着培养时间增加,NK细胞比例增高,其他淋巴细胞亚群比例减少,见图6—图9。

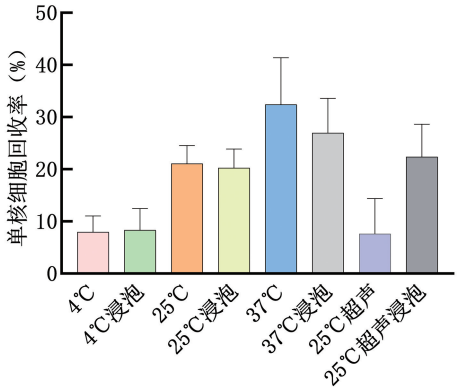


图5　不同反冲条件单核细胞回收率的影响

Figure 5　The influence of various backflush conditions on the recovery rate of monocytes

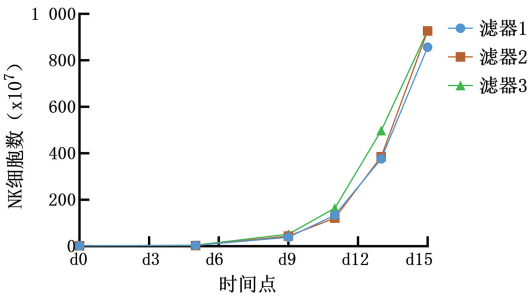


图6　NK细胞培养过程中不同时间点的细胞数量

Figure 6　The number of NK cells during the culture process at different time points

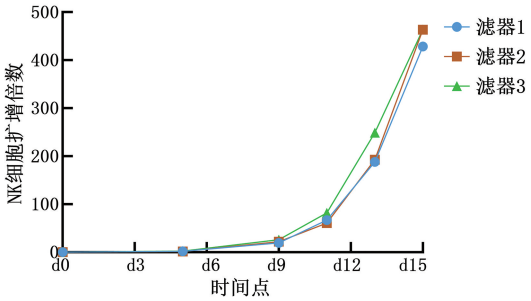


图7　NK细胞培养过程中不同时间点的扩增曲线

Figure 7　The expansion curves of NK cells during the culture process at different time points

3　讨论

目前临床使用的血液制品主要是来源于全血,包括去白悬浮红细胞、浓缩血小板和冰冻血浆等。对于白细胞滤器来说,尽管其在滤白后作为废弃物

丢弃,但其中仍保留了大量珍贵的免疫细胞,尤其是淋巴细胞和单核细胞等,这些细胞对免疫治疗和细胞生物学研究具有重要价值[8-9]。

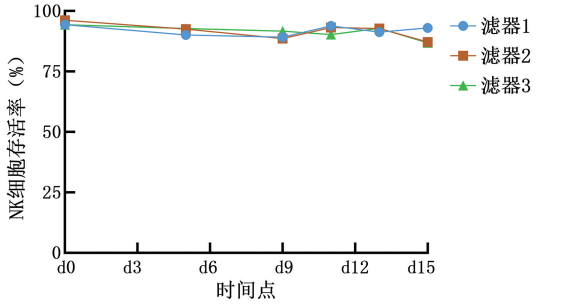


图 8　NK 细胞培养过程中不同时间点的细胞存活率

Figure 8　The cell survival rates of NK cells during the culture process at different time points

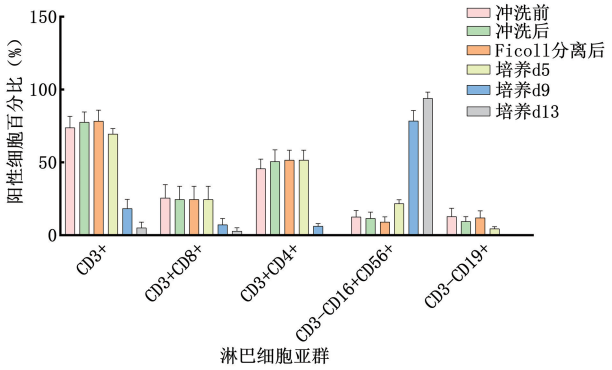


图 9　NK 细胞培养过程中淋巴细胞亚群阳性细胞百分比

Figure 9　The percentage of positive cells in lymphocyte subsets during the culture of NK cells

目前从白细胞滤器中回收免疫细胞的常规手段是基于盐溶液的冲洗法,所使用的冲洗液通常是生理盐水或 PBS 等[10]。本研究对比了生理盐水、PBS 及含 EDTA 的 PBS 的反冲效果,发现 3 种反冲液反冲的细胞回收率无差异(P>0.05)。生理盐水反冲的变异系数低于 PBS 和 PBS-EDTA,说明生理盐水反冲的批间波动更小,在实际操作中具有更好的稳定性和可重复性。除冲洗液的种类,不同反冲条件也可能对细胞回收效果产生影响,包括滤器的规格、冲洗方式和反冲液用量等因素[11-13]。本研究比较了不同反冲液温度的影响,包括储存温度(4℃)、环境温度(25℃)和体温(37℃)。试验结果提示 37℃反冲效果明显优于 4℃和 25℃,这可能是由于 37℃模拟了体内生理环境,使细胞流动力增强。

基于白细胞过滤器主要通过机械阻滞和吸附滤除白细胞的原理,我们在改变反冲液温度的同时对滤器增加了浸泡和超声处理。试验结果显示浸泡处理对细胞回收率的提升作用因温度而异,虽然浸泡处理后反冲的细胞回收率总体上高于直接反冲,但差异无统计学意义。超声处理虽然也总体上提高了细胞回收率,但差异无统计意义。超声的作用机制可能是超声在液相中传播时产生的空化效应和微流剪切力共同作用,物理性地将吸附于纤维表面的细胞“振落”。空化泡在破裂瞬间释放的微射流和冲击波可破坏细胞-纤维之间的非特异性黏附,同时微声流产生的持续剪切力进一步促进已松动的细胞从纤维网格中脱离。值得注意的是,本研究观察到超声处理对中性粒细胞的释放无显著促进作用,这可能与中性粒细胞体变形能力强且更易迁移至滤器深层纤维有关。此外,中性粒细胞高表达 Mac-1(CD11b/CD18),其与滤器表面的纤维蛋白原等配体可能形成更稳定的黏附,对物理解离更具耐受性。然而,超声参数的选择至关重要:能量过高会直接裂解细胞,能量过低则效果不佳。本研究采用的 100 W、20 kHz、5 min 间歇性超声条件可能恰好达到了 1 个理想的平衡点,足以破坏细胞与纤维的物理吸附,但又不足以导致细胞膜破裂或内容物泄漏。后续培养扩增实验也证实,超声处理后回收的细胞活率可达 90%以上,且扩增能力未受明显影响。

随着免疫疗法的发展,NK 细胞因其在肿瘤免疫中的关键作用受到关注。作为先天免疫细胞,NK 细胞无需预先致敏即可直接识别并杀伤肿瘤细胞,具有独特的治疗优势[14]。本研究主要考察从白细胞滤器回收 PBMCs 并分离培养 NK 细胞阶段的所有参数效率,并最终评估本研究结果是否能将废弃白细胞滤器确立为 NK 细胞的可行且有效的来源。我们回收的 NK 细胞分选纯度(94.2%)、活率(94.8%)及扩增能力均达到了极高水平。虽然免疫细胞在过滤过程中经历了缺氧和机械压迫,但从滤器中分离后在适宜的培养环境中能够迅速恢复并进入增殖状态。同时,滤器中的 NK 细胞保留了完整的信号传导通路和增殖潜能,其功能完整性并未因短暂的物理应激而受损。获得超过 10^6 个/mL 高纯度 NK 细胞正是临床回输的基础剂量要求[15-16]。这为 NK 细胞免疫治疗的大规模制备开辟了 1 条全新的、符合伦理且成本极低的原料来源路径。

综上所述,本研究建立了 1 种从废弃白细胞滤器中高效回收免疫细胞的新方法:采用 60 mL 生理盐水 37℃条件下反向冲洗滤器,即可获得高活性的 PBMCs,尤其是淋巴细胞。该方法操作简便、成

本低廉,回收的细胞质量卓越,具有临床应用潜力。该技术能显著提高细胞回收率,但研究仍处于实验室阶段,未来需开发封闭式无菌系统。滤器反冲为免疫细胞治疗,特别是 NK 细胞疗法提供了新的细胞来源,未来将致力于开发自动化封闭式系统及标准化工艺流程。

利益冲突说明/Conflict of Interests

所有作者均声明不存在利益冲突。

伦理批准及知情同意/Ethics Approval and Donor Consent

本研究已通过长春市中心血站医学伦理审查委员会审批(批准号:XZLSC-2026001);本研究纳入的所有献血者均已签署知情同意书。

作者贡献/Authors' Contribution

周雪冰:试验设计和实施、数据分析、论文撰写;李茹意:试验实施和协助;袁红、张雪松:试验技术指导、论文审核;史雨、杨旭:试验协助、数据分析;窦柏蕊:试验实施;焦立新:论文审核;韩瑜:研究思路提出、实验方案筹备、论文修改和审核。

[参考文献]

[1] SUN L, LI R, CAI S, et al. Recovery efficiency and functional characterization of T cells and NK cells from leukocyte filters[J]. Front Med, 2025,12:1681146.

[2] SASANI N, ROGHANIAN R, EMTIAZI G, et al. Design and introduction of a rational mechanical eluting system for leukocyte recovery from leukoreduction filters: A cell differential approach[J]. Transfus Clin Biol, 2020, 27(4):229-235.

[3] GOURLAY T, OLIVENCIA-YURVATI A H, GUNAYDIN S. STS blood conservation guidelines: the role of leukocyte filtration[J]. Ann Thorac Surg, 2008, 85(3):1138-1139.

[4] 陈小林, 李冬妹, 徐彬, 等. 从滤白后的白细胞滤器中回收外周血单个核细胞的可行性研究[J]. 北京医学, 2020, 42(4):340-343.
CHEN X L, LI D M, XU B, et al. The feasibility of PBMCs recovery from white cell-reduced filters after filtration[J]. Beijing Med J, 2020, 42(4):340-343.

[5] REZWANI M, MAZARZAEI A, ABBASI-MALATI Z, et al. Leukocyte reduction filters are reliable and economic source for natural killer cell preparation[J]. Iran J Immunol, 2023, 20(1):114-128.

[6] 曹腾宇, 林华雨, 张璇之, 等. 全血来源 NK 细胞分离纯化技术体系的初步构建[J]. 中国输血杂志, 2025, 38(2):181-188.
CAO T Y, LIN H Y, ZHANG X Z, et al. Construction of a system for isolation and purification of NK cells from whole blood donations[J]. Chin J Blood Transfusion, 2025, 38(2):181-188.

[7] PEYTOUR Y, VILLACRECES A, CHEVALEYRE J, et al. Discarded leukoreduction filters: a new source of stem cells for research, cell engineering and therapy[J]. Stem Cell Res, 2013, 11(2):736-742.

[8] VALIZADEH M, PURFATTOLLAH AA, RAOOFIAN R, et al. Optimized simple and affordable procedure for differentiation of monocyte-derived dendritic cells from LRF: An accessible and valid alternative biological source[J]. Exp Cell Res, 2021, 406(2):112754.

[9] SIX K R, VERTONGEN S, SEGHERS S, et al. Differential composition and yieldof leukocytes isolated from various blood component leukoreduction filters[J]. J Immunol Methods, 2024, 533:113733.

[10] 林菊,相志强, 杜东芬, 等. 从滤白残留物中回收单个核细胞的稳定性研究[J]. 中国输血杂志, 2025, 38(5):723-733.
LIN J, XIANG Z Q, DU D F, et al. Study on the stability of PBMCs recovered from leukocyte-depleted filter residues[J]. Chin J Blood Transfusion, 2025, 38(5):723-733.

[11] BASHIRI DEZFOULI A, POURFATTOLLAH AA, NIKOUGOFTAR-ZARIF M, et al. Optimizing the recovery of peripheral blood mononuclear cells trapped in leukoreduction filters - A comparison study[J]. Hematol Transfus Cell Ther, 2022, 44(2):197-205.

[12] HE H, TANG L, JIANG N, et al. Characterization of peripheral blood mononuclear cells isolated using two kinds of leukocyte filters[J]. Transfus Clin Biol, 2020, 27(1):10-17.

[13] BOUDREAU G, CARLI C, LAMARCHE C, et al. Leukoreduction system chambers are a reliable cellular source for the manufacturing of T-cell therapeutics[J]. Transfusion,2019,59(4):1300-1311.

[14] MOAZZENI A, KHEIRANDISH M, KHAMISIPOUR G, et al. Leukoreduction filter derived NK cells offer a promising source for off the shelf CAR NK cell immunotherapy[J]. Sci Rep, 2025, 15(1):12755.

[15] WU Y, WANG Y, JI J, et al. A pilot study of cord blood-derived natural killer cells as maintenance therapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation[J]. Ann Hematol, 2023, 102(11):3229-3237.

[16] CIUREA S O, KONGTIM P, SROUR S, et al. Results of a phase I trial with Haploidentical mbIL-21 ex vivo expanded NK cells for patients with multiply relapsed and refractory AML[J]. Am JHematol, 2024, 99(5):890-899.

(2026-05-20 收稿,06-02 修回,06-18 接收)

本文编辑:闻欣